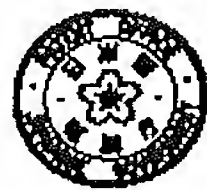


(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04091783 A**

(43) Date of publication of application: **25.03.92**

(51) Int. Cl

C12N 1/21
C12N 15/64
//(C12N 15/64 , C12R 1:19)

(21) Application number: **02209641**

(22) Date of filing: **07.08.90**

(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**

(72) Inventor:
INOUE HIROAKI
SASAKI AKIKO
OKA MASANORI
AISUI SHIGENORI
OKAYAMA HIROTO
NOJIMA HIROSHI

**(54) BUFFER SOLUTION FOR CONVERTING E.COLI
TO COMPETENT CELL AND METHOD FOR
CONVERTING E.COLI TO COMPETENT CELL**

(57) Abstract:

PURPOSE: To improve the transformation efficiency of E.coli by using a competent cell-forming buffer solution containing manganese chloride, calcium chloride, potassium chloride and a compound selected from a specific group.

CONSTITUTION: An E.coli strain such as Escherichia coli DH5 is cultured and the cells are collected e.g. by

centrifugal separation. The collected E.coli cells are treated in ice water with a competent cell-forming buffer solution containing manganese chloride, calcium chloride, potassium chloride and one or more compounds selected from piperazine-N,N-bis(2-ethanesulfonic acid), N-(2-hydroxymethyl)piperazine N-2-ethanesulfonic acid, etc., and potassium acetate. The prepared competent cell suspension is frozen and preserved in the vapor phase of liquid nitrogen. The transformation efficiency of E.coli can be improved, in some case, 2-10 times as high as that of conventional process.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-91783

⑬ Int. Cl.⁵

C 12 N 1/21
15/64

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)3月25日

8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 大腸菌のコンピテントセル化緩衝液および大腸菌のコンピテントセル化方法

⑯ 特 願 平2-209641

⑰ 出 願 平2(1990)8月7日

⑱ 発 明 者 井 上 浩 明 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内

⑲ 発 明 者 佐 々 木 晶 子 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内

⑳ 発 明 者 岡 正 則 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内

㉑ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

大腸菌のコンピテントセル化緩衝液および大腸菌のコンピテントセル化方法

2. 特許請求の範囲

(1) (a)塩化マンガン、(b)塩化カルシウム、(c)塩化カリウムおよび(d)ピペラジシン-N,N'-ビス-(2-エタンスルホン酸)、N-(2-ヒドロキシメチル)ピペラジシン-N'-2-エタンスルホン酸、N,N'-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、3-(N-モノフォリノ)プロパンスルホン酸および酢酸カリウムからなる群から選ばれた少なくとも一種の化合物を含むことを特徴とする大腸菌のコンピテントセル化緩衝液。

(2) 請求項(1)の緩衝液によって大腸菌を処理することを特徴とする大腸菌のコンピテントセル化方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、化学的処理による大腸菌のコンピテントセル化の際に使用するコンピテントセル化緩衝液および該緩衝液を用いた大腸菌のコンピテントセル化方法に関する。

(従来の技術)

大腸菌のコンピテントセル化は、Handel & Rigaによる報告以来数多くの調製法が報告されている。特にHanahanらの報告(J. Mol. Biol. 1983 166.557-580)では、いくつかの大腸菌に関して高効率の形質転換を可能とする方法が報告されている。

(発明が解決しようとする課題)

Hanahanらは、 1.5×10^8 colonies / μ g - pBR322の高効率の形質転換能を有するコンピテントセルを大腸菌より調製する方法について報告しているが(J. Mol. Biol. 1983 166.557-580)、この方法では、高効率の形質転換能を有するコンピテントセルを安定して再現性よく調製する事が困難であ

る。また保存の間にしばしばその形質転換効率が低下することが観察されている。また、大腸菌の効率良い形質転換方法として、最近、高電圧電気穿孔による方法がWilliam J. Dower, Jeff F. Miller & Charles W. Ragsdaleらによって報告されている。(Nucleic Acid Research 1988 Vol. 166 Number 13 6127-6144) しかし、電気穿孔法では処理する大腸菌懸濁液の塩濃度が非常に制限されるため、形質転換に用いるプラスミド溶液の状態が著しく限定されていた。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、大腸菌の化学的処理によるコンピテントセル化の際の、緩衝液について検討しその最適成分を見だし、上記の課題を解決する事に成功した。

すなわち、本発明は(a)塩化マンガン、(b)塩化カルシウム、(c)塩化カリウムおよび(d)ピペラジン-N,N'-ビス-(2-エタンスルホン酸)、N-(2-ヒドロキシメチル)ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、N,N'-ビス-(2-ヒドロキ

シエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、3-(N-モノフォリノ)プロパンスルホン酸および酢酸カリウムからなる群から選ばれた少なくとも一種の化合物を含むことを特徴とする大腸菌のコンピテントセル化緩衝液および該緩衝液によって大腸菌を処理することを特徴とする大腸菌のコンピテントセル化方法である。

本発明を実施するに当たっては、まず大腸菌を通常の液体培養で培養する。本発明において使用される大腸菌は特に限定されず、例えば、エッシャーヒア コリー DH5、エッシャーヒア コリー HB101、エッシャーヒア コリー JM109等を例示することができる。培地の栄養源としては、通常微生物の培養に用いられるものが広く用いられる。窒素源としては、利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、酵母抽出物、肉抽出物等が使用される。炭素源としては特に必要としないが、例えばグルコース、シュークロース、マンニトール等を必要であれば添加してもよい。その他、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネ

シウム、塩化マグネシウム、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウムなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は、菌が発育可能な範囲内で適宜変更し得るが、好ましくは16℃～37℃、特に17℃～20℃が好ましい。

培養は回転式振とう機、または往復式振とう機を用いて行う。回転数、または振とう数は、使用する培養器、及び振とう機の振幅によって適宜設定すればよい。

培養時間は、使用する大腸菌、培養温度によって異なる。培養終了は対数増殖期中期が好ましいが、使用する大腸菌の種類によって適宜決定すればよい。この様にして得られた大腸菌の菌体を、遠心分離等によって集め、コンピテントセル化緩衝液にて処理する。

本発明のコンピテントセル化緩衝液は、(a)塩化マンガン10～100mM好ましくは、20～60mM、(b)塩化カルシウム5～40mM好ましくは10～30mM、(c)塩化カリウム10～1000mM好ましくは100～500mM、(d)

ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-(2-ヒドロキシメチル)ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、N,N'-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、3-(N-モノフォリノ)プロパンスルホン酸および酢酸カリウムからなる群から選ばれた少なくとも一種の化合物1～50mM、好ましくは1～40mMを含有し、pHは5.5～7.5、好ましくは6.5～7.0である。なお、前記各物質の添加順序、添加方法は特に限定されない。

コンピテントセル化緩衝液による処理方法は、集菌した大腸菌菌体を水中で、培地容量の1～1/5培養量のコンピテントセル化緩衝液で懸濁後水中に10～30分放置後、遠心分離によって再度菌体を集める。この操作を1～3回繰り返した後、菌体を水中で培地容量の1/10～1/20容量のコンピテントセル化緩衝液に懸濁後、ジメチルスルホキシドを4～10%好ましくは6～8%となるように添加し、更に、水中で10～30分放置する。保存のために、この様に調製したコンピテントセル懸濁

液を凍結保存用バイアルに分注後、液体窒素液相中にて凍結後、液体窒素気相中で保存する。

本発明によってコンピテントセル化された大腸菌の形質転換効率は、以下に述べる測定法に基づいて測定した。

形質転換効率の測定法

上記のような方法で調製、保存されているコンピテントセルを室温にて溶解後200 μ lを、1ng/ μ lのアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドpBR322溶液1 μ lとをGreiner製15ml容ポリプロピレンチューブ内で混合し、氷中30分放置する。次いで、42℃にて30秒加温処理し、更に氷中にて1分間冷却する。SOC（培地の一種組成：バクトプトウン2.0%、バクトイースト抽出物0.5%、塩化ナトリウム10mM、塩化カリウム2.5mM、硫酸マグネシウム10mM、塩化マグネシウム10mM、グルコース2mM）800 μ lを添加後、37℃にて150rpmの速度で振とう培養する。1時間後、50 μ g/ μ lのアンピシリンを含むLB寒天培地に、上記コンピテントセル懸濁液を10～1000倍希釈後その100

μ lを撒き広げ、37℃で15～18時間培養後、形成されたコロニーの数を求める。得られたコロニー数より、pBR322 1 μ g当り形質転換される大腸菌のコロニー数を求め、これをコンピテントセルの形質転換効率とする。

（実施例）

次いで実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらにより限定されるものではない。

実施例1

エッシャーヒアコリーDH5の凍結保存株を融解後、LB寒天培地上に懸練し37℃にて1晩培養した。直径1.5-2mmのコロニーを10-15個取り250 μ l SOB培地（2%バクトトリプトン、0.5%バクトイースト抽出物、10mM塩化ナトリウム、2.5mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウム、10mM硫酸マグネシウム）/2L-フラスコに植菌した。18℃にてOD₆₀₀=0.6まで約48時間培養した。培養終了後、フラスコを氷上に移し10分間冷却した。培養液を500 μ l溶遠心管に移し、約2500gで10分間4℃で

遠心した。得られた菌体ペレットを氷冷コンピテントセル化緩衝液（塩化マンガン50mM、塩化カルシウム15mM、塩化カリウム250mM、ピペラジン-N,N'-ビス-（2-エタンスルホン酸）10mM、pH6.7）80 μ lで懸濁後、氷上で10分間冷却した。次いで約2500gで10分間4℃で遠心した。上清を捨て、得られた菌体を再度上記氷冷コンピテントセル化緩衝液20 μ lに懸濁し、更にジメチルスルホキシドを、1.5 μ l加え、氷上で10分間冷却した。次いで約1 μ lずつ凍結保存用バイアルに移し、液体窒素液相中にて凍結した。この様に調製した凍結コンピテントセルを液体窒素気相にて保存した。凍結保存コンピテントセルを室温にて融解後、1 μ lの1ng/ μ lのプラスミドpBR322溶液に対し200 μ l加え、氷中で30分冷却した。次いで、42℃にて30秒加温処理し、再度氷中にて2分間冷却した。800 μ lのSOC培地を加え、37℃にて1時間、約150rpmの回転数で振とう培養した。1時間後、上記処理液を10～1000倍希釈後その100 μ lを分取し、約3 μ lの約50℃のLB上層寒天培地（LB寒天

培地の成分中寒天の濃度を1.7%→0.5%としたもの）と混合後、50 μ g/ μ lのアンピシリンを含有するLB寒天培地上に広げた。37℃にて1晩培養後、培地上に形成された形質転換体のコロニーの数を求め、形質転換効率を算出した。結果を第1表に示す。

実施例2

エッシャーヒアコリーHB101を使用大腸菌として実施例1と同様にコンピテントセルの調製及び形質転換を行い形質転換効率を求めた。結果を第1表に示す。

実施例3

エッシャーヒアコリーJM109を使用大腸菌として実施例1と同様にコンピテントセルの調製及び形質転換を行い形質転換効率を求めた。結果を第1表に示す。

第1表

使用菌株	形質転換効率
エッシャーヒア コリーDH5	3.0×10^9 colonies/ μ g-pBR322
エッシャーヒア コリーHB101	1.1×10^9 colonies/ μ g-pBR322
エッシャーヒア コリーJM109	1.2×10^9 colonies/ μ g-pBR322

実施例 4

エッシエリヒアコリーDH5を使用大腸菌として、実施例 1 のコンピテントセル化緩衝液組成のうちピペラジーン-N,N' ビスー(2-エタンスルホン酸) (PIPES) を他の緩衝能を有する第 2 表に示す化合物と置換したコンピテントセル化緩衝液 (他の成分 pH は変更なし) を用い実施例 1 と同様にコンピテントセルの調製及び形質転換を行い形質転換効率を求めた。第 1 図に PIPES を用いた際に対する相対効率を示す。

第 2 表

1	酢酸カリウム (CH ₃ COOK)
2	N-(2-ヒドロキシメチル)ピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)
3	N,N-ビスー(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸 (BES)
4	3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)

実施例 5

コンピテントセル化緩衝液組成を第 3 表に示す組成とした種々のコンピテントセル化緩衝液を用いエッシエリヒアコリーDH5を使用大腸菌として

第 4 表

10mM	酢酸カリウム
100mM	塩化カリウム
45mM	塩化マンガン
10mM	塩化カルシウム
3mM	ヘキサアンミンコバルト (III) 塩化物
10%	グリセロール
pH 6.4	

なお、第 7 図において 1 は 37℃ にて培養した菌体を本発明によるコンピテントセル化緩衝液にて処理して得たコンピテントセルの形質転換効率を 100 として表しており、2 は 37℃ にて培養した菌体を Hanahan らの報告に記載の緩衝液にて処理して得たコンピテントセルの形質転換効率の 1 に対する相対値を表している。

(発明の効果)

本発明の緩衝液を使用して、大腸菌のコンピテントセル化を行うことにより、大腸菌の形質転換効率を、従来の方法で調製した大腸菌のコンピテン

実施例 1 と同様にコンピテントセルの調製及び形質転換を行い形質転換効率を求めた。a ~ e の結果をそれぞれ、第 2 ~ 第 6 図に示す。

第 3 表

	a	b	c	d	e
塩化カルシウム	0-50mM	15mM	15mM	15mM	15mM
塩化マンガン	55mM	0-100mM	55mM	55mM	55mM
塩化カリウム	250mM	250mM	0-1000mM	250mM	250mM
PIPES	10mM	10mM	10mM	0-50mM	10mM
pH	6.7	6.7	6.7	6.7	5.5-7.5

比較例 1

Hanahan らの報告 (J. Mol. Biol. 1983 166.557-580) に記載されている条件でエッシエリヒアコリーDH5を使用大腸菌として用い、コンピテントセルを調製した。使用緩衝液組成を第 4 表に示す。また、同時に本発明によるコンピテントセル化緩衝液を用いて菌体の処理を行った。結果を第 7 図に示す。

トセルを用いて行う場合に比べて、菌株により 2 ~ 10 倍高めることができる。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は緩衝液に含まれる成分として PIPES を使用した場合の形質転換効率を 100 として、PIPES を他の成分に置換した場合の相対比を示す。

第 2 図は緩衝液組成のうち、塩化カルシウムの組成を変化させた場合の形質転換効率の相対比を示す。

第 3 図は緩衝液組成のうち、塩化マンガンの組成を変化させた場合の形質転換効率の相対比を示す。

第 4 図は緩衝液組成のうち、塩化カリウムの組成を変化させた場合の形質転換効率の相対比を示す。

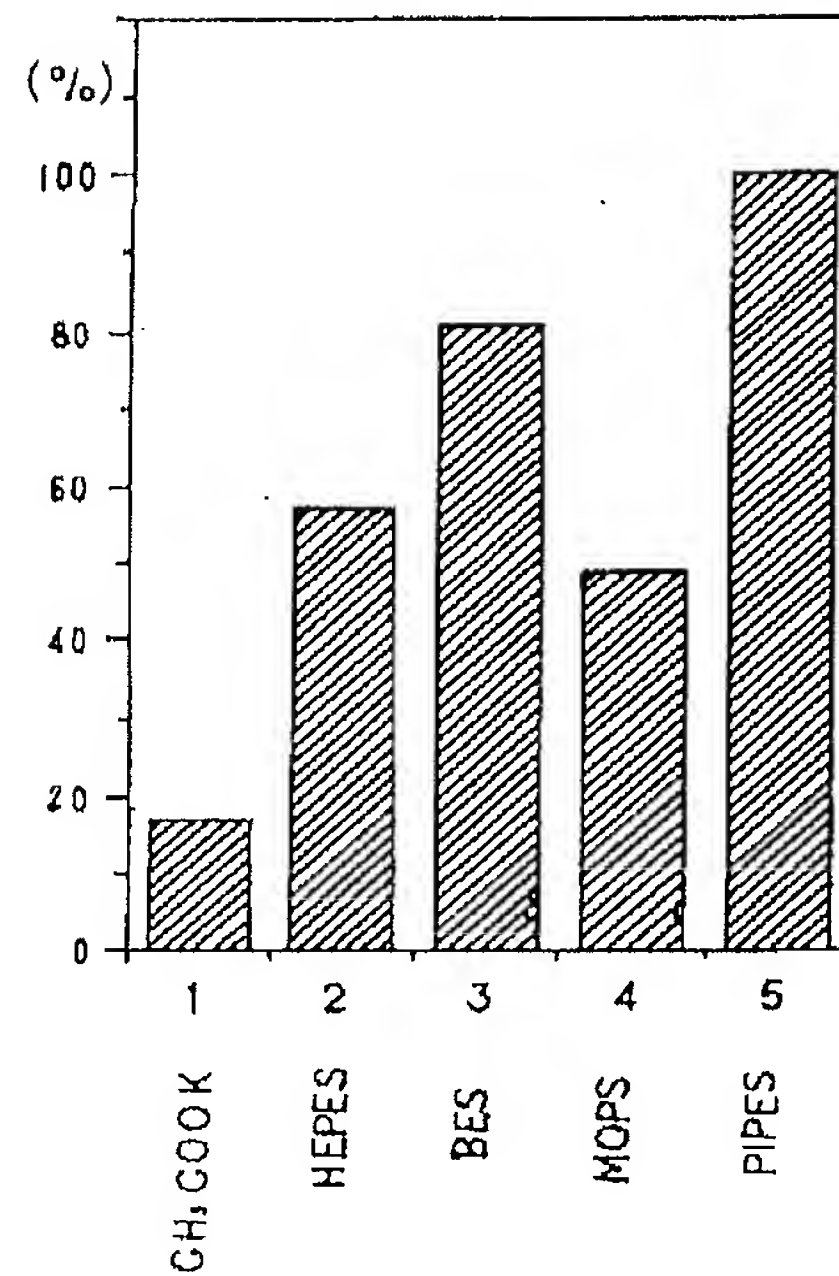
第 5 図は緩衝液組成のうち、PIPES の組成を変化させた場合の形質転換効率の相対比を示す。

第 6 図は緩衝液組成の pH を変化させた場合の形質転換効率の相対比を示す。

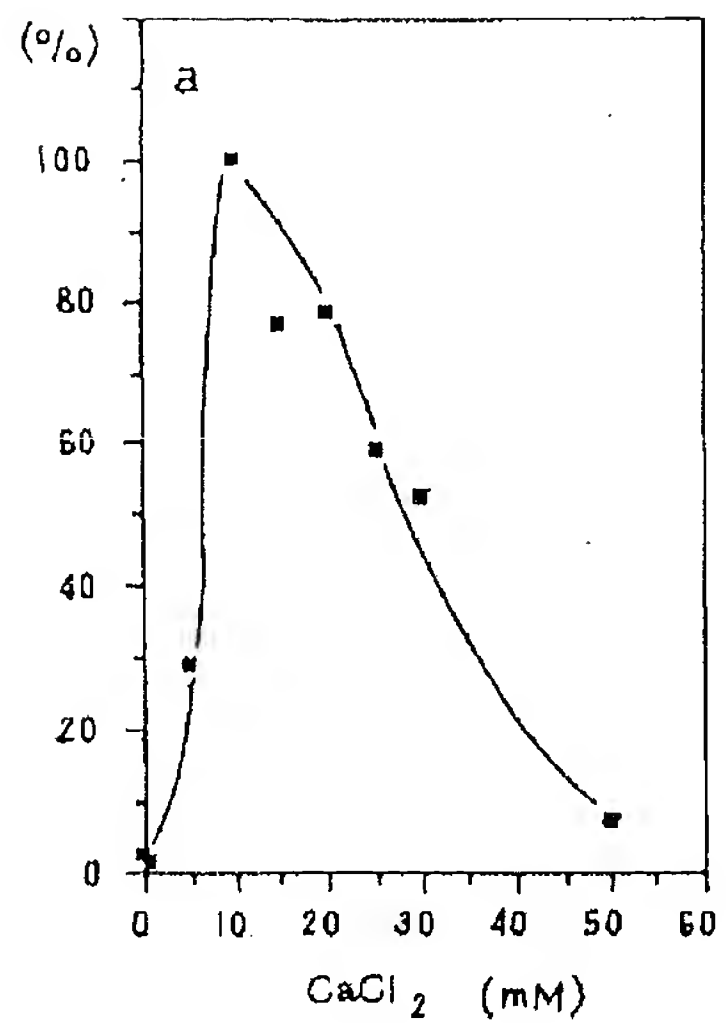
第7図は、本発明の緩衝液によって処理したコンピテントセルの形質転換効率と、従来の緩衝液によって処理したコンピテントセルの形質転換効率の対比を示す。

特許出願人 東洋紡績株式会社

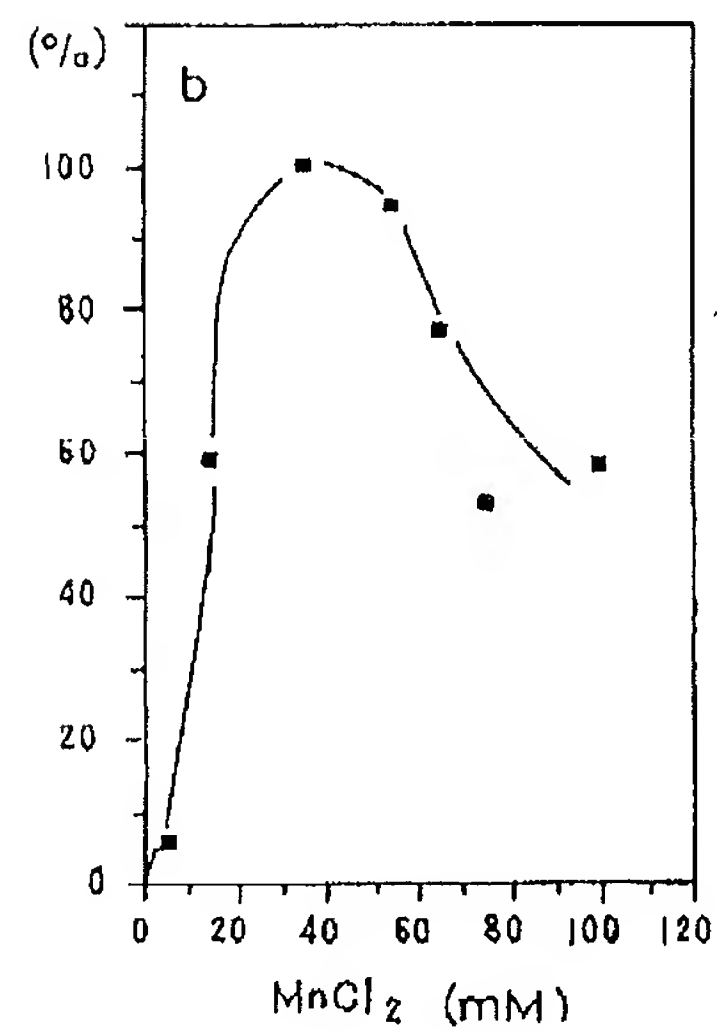
第1図



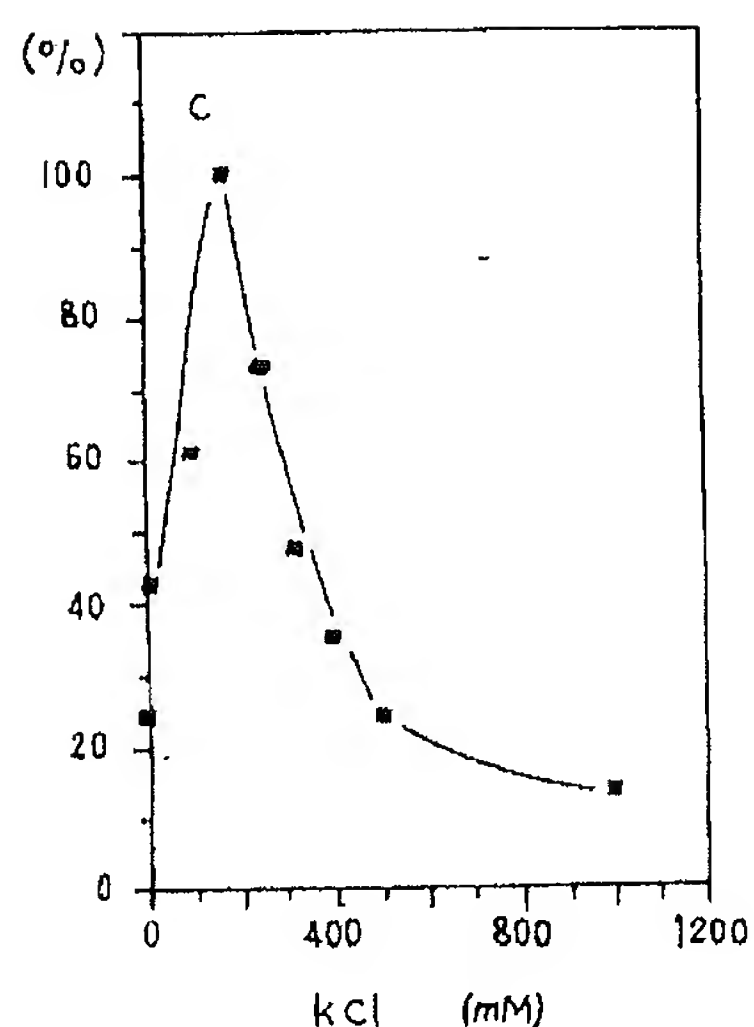
第2図



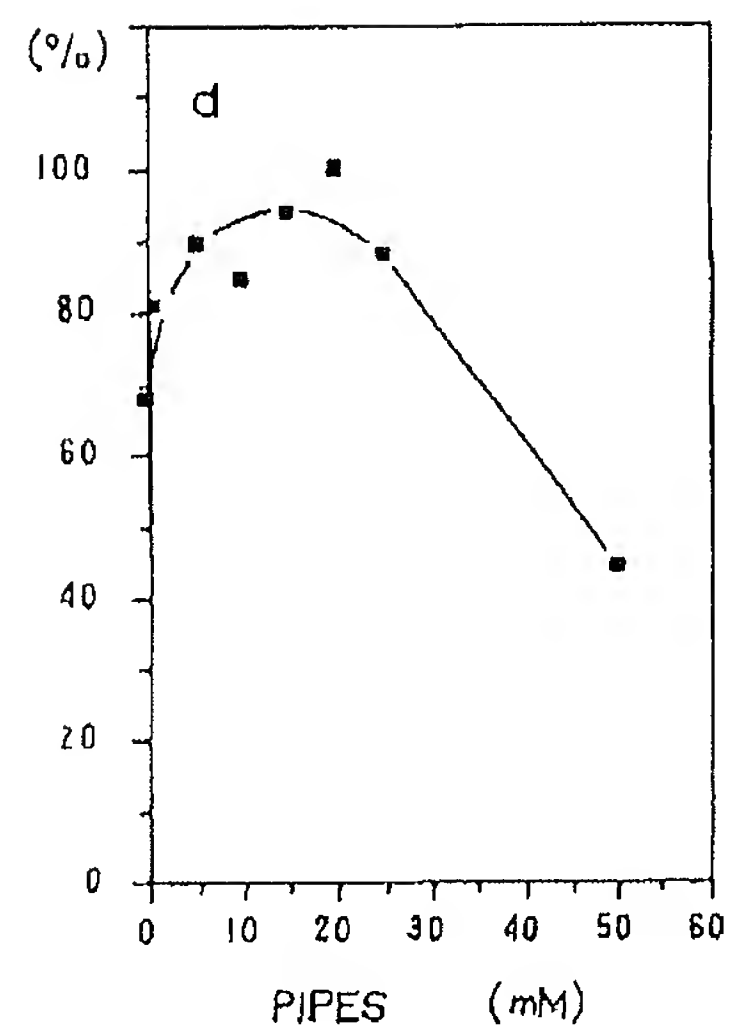
第3図



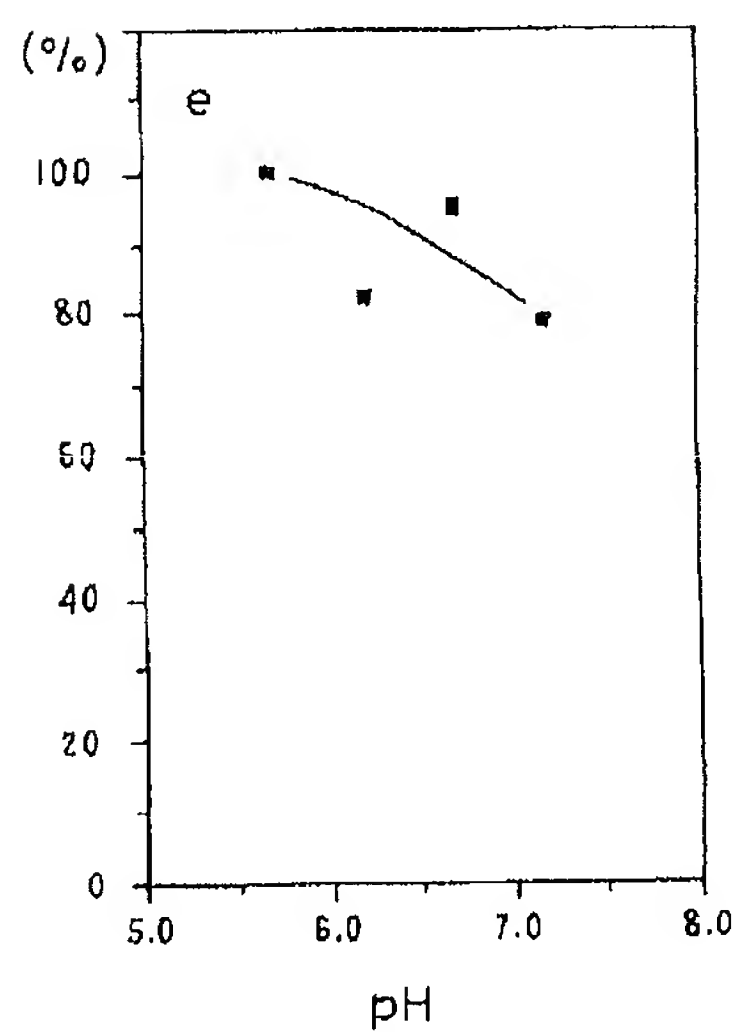
第 4 図



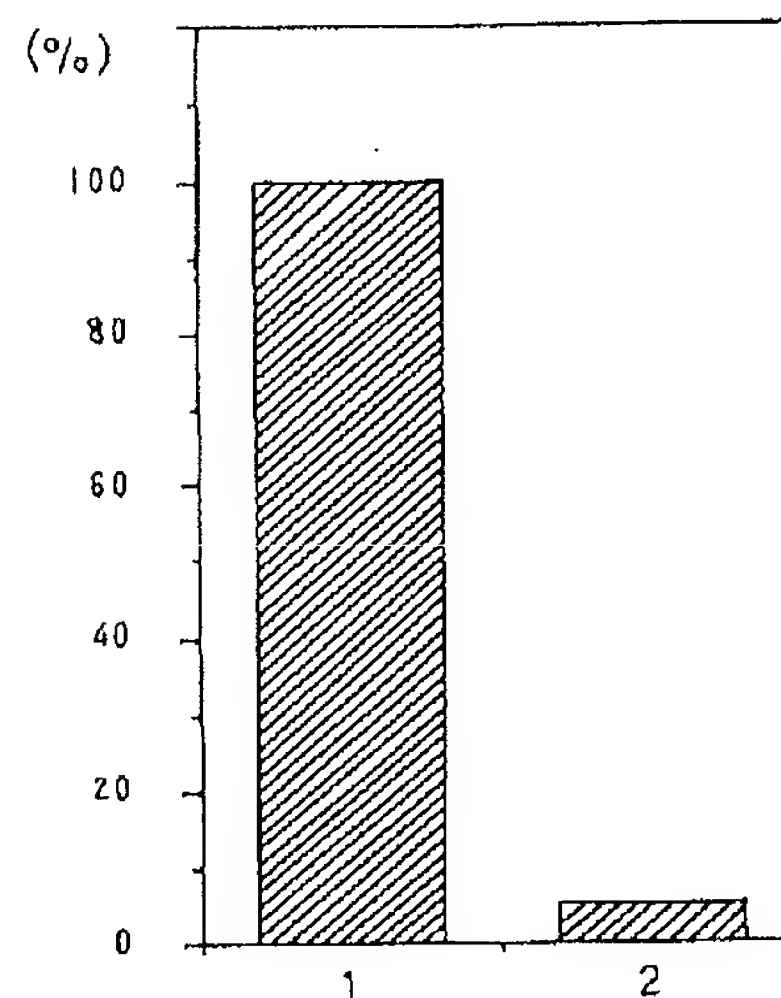
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
// (C 12 N 15/64 C 12 R 1:19)		8319-4B
⑦発明者 愛水 重典		福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
⑦発明者 岡山 博人		大阪府箕面市小野原東3-11-15-133
⑦発明者 野島 博		大阪府豊中市西緑丘1-4-27-123

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第1部門第1区分
【発行日】平成8年（1996）8月27日

【公開番号】特開平4－91783
【公開日】平成4年（1992）3月25日
【年通号数】公開特許公報4－918
【出願番号】特願平2－209641
【国際特許分類第6版】

C12N 1/21
15/09
//(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 15/09
C12R 1:19)
【F I】
C12N 1/21 8828-4B
15/00 A 9281-4B

手続補正書（自発）

平成7年5月11日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示
- 平成2年特許願第209641号
2. 発明の名称
- 大腸菌のコンピテントセル化緩衝液および大腸菌の
コンピテントセル化方法
3. 補正をする者
- 事件との関係 特許出願人
大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
(316) 東洋紡織株式会社
代表者 柴田 悠
4. 補正の対象
- 明細書の発明の詳細な説明の欄
5. 補正の内容
- (1) 明細書第7頁第8～9行の「1ng/ml」を「1ng/μl」と補正する。
(2) 明細書第7頁第13～14行の「バクトトブトワン」を「バクトトリプト
ン」と補正する。
(3) 明細書第7頁第17行の「2mM」を「20mM」と補正する。
(4) 明細書第8頁第3～4行の「大腸菌のコロニー数」を「大腸菌の数」と補
正する。
(5) 明細書第9頁第14行の「1ng/ml」を「1ng/μl」と補正する。